

肝动脉血流对兔 VX₂ 肝脏肿瘤 冷冻效果的影响

郭志 倪虹 李保国 胡永华 邢文阁 刘方

【摘要】 目的 通过建立兔 VX₂ 肝脏肿瘤模型, 观察肝动脉血流对氩氦超低温冷冻消融治疗效果的影响。方法 30 只成功建立 VX₂ 肝脏肿瘤模型的实验兔, 于肿瘤种植后第 14 天, 用数字表法随机等分为 3 组。调整肝动脉血流, 肝动脉完全阻断组为 A 组, 部分阻断组为 B 组, 正常对照组为 C 组。行 CT 平扫和灌注扫描, 计算各组肿瘤组织血流量 (BF)、血容量 (BV), 采用方差分析法分析 3 组参数之间的差别。然后行氩氦冷冻治疗, 术后即刻处死实验兔, 取出肝脏。取肝脏肿瘤冷冻区及其周围组织分别进行氯化硝基四氮唑蓝 (TTC) 及四甲基偶氮唑 (MTT) 染色, 观察大体及镜下病理改变。结果 (1) 肿瘤种植后第 14 天, A 组肿瘤组织的 BF 和 BV 值分别为 $(7.23 \pm 2.15) \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $(1.63 \pm 0.52) \text{ ml}/100 \text{ g}$; B 组分别为 $(32.65 \pm 6.12) \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $(9.32 \pm 2.63) \text{ ml}/100 \text{ g}$; C 组分别为 $(61.34 \pm 12.15) \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $(17.51 \pm 3.14) \text{ ml}/100 \text{ g}$, 3 组间差异均有统计学意义 (F 值分别为 452.16 和 421.33, $P < 0.01$)。 (2) TTC 染色显示, 肿瘤组织平均最大冷冻直径 A 组为 $(2.3 \pm 0.3) \text{ cm}$, B 组为 $(1.5 \pm 0.2) \text{ cm}$, C 组为 $(0.8 \pm 0.1) \text{ cm}$, 3 组差异有统计学意义 (F 值为 315.32, $P < 0.01$)。 (3) MTT 染色可见界限清楚的冷冻区、交界带及周围正常染色区; 在未结扎肝动脉的 C 组可见无染色的冷冻区内部分血管周围组织染色阳性。结论 减少肝动脉血流可明显提高肝癌冷冻治疗的效果。

【关键词】 模型, 动物; 肝肿瘤, 实验性; 冷冻外科手术; 治疗效果; 肝血流量

Effect of hepatic blood flow alteration on the therapeutic effect of cryoablation in VX₂ hepatic tumor rabbit: an experimental study GUO Zhi, NI Hong, LI Bao-guo, HU Yong-hua, XING Wen-ge, LIU Fang. Department of Interventional Therapy, Cancer Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China

Corresponding author: NI Hong, Email: nihong@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of alteration of blood flow in the hepatic artery on the therapeutic effect of cryoablation in VX₂ hepatic tumor rabbit model. Methods Thirty rabbits with VX₂ hepatic tumor were divided into three groups according to hepatic artery blood flow: complete occlusion of the hepatic artery (group A), partial occlusion of the hepatic artery (group B), and no occlusion of the hepatic artery (group C). With conventional CT scan and perfusion scan, the values of blood flow (BF) and blood volume (BV) of VX₂ tumor were computed and the differences among the three groups were analyzed. After cryoablation, the animals were euthanized and the livers were removed. The hepatic tissue from the cryoablation area and surrounding area underwent both methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) diaphorase staining and triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining. The gross pathology and histopathological changes were observed. Results (1) The BF and BV in the three groups were: $(7.23 \pm 2.15) \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and $(1.63 \pm 0.52) \text{ ml}/100 \text{ g}$ in group A; $(32.65 \pm 6.12) \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and $(9.32 \pm 2.63) \text{ ml}/100 \text{ g}$ in group B; $(61.34 \pm 12.15) \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and $(17.51 \pm 3.14) \text{ ml}/100 \text{ g}$ in group C, respectively. There were significant differences among the three groups in the BF and BV (F value was 452.16 and 421.33 in the BF and BV, respectively, $P < 0.01$); (2) The maximum diameter of cryoablation-induced necrosis was $(2.3 \pm 0.3) \text{ cm}$ in group A, $(1.5 \pm 0.2) \text{ cm}$ in group B, and $(0.8 \pm 0.1) \text{ cm}$ in group C, respectively. The difference was significant among the groups (F value was 315.32, $P < 0.01$). (3) There were well-defined frozen areas, bordering areas and normal surrounding areas in MTT staining. In group C, positive staining around some blood vessels could be seen.

基金项目:天津市自然科学基金资助项目(05YFJMJC0410)

作者单位:300060 天津医科大学附属肿瘤医院介入治疗科

通信作者:倪虹, Email: nihong@yahoo.com.cn

Conclusion Alteration of the blood flow in the hepatic artery can affect the cryoablation efficacy. With the decrease of hepatic artery blood flow, the efficacy of cryoablation on liver tumor increased.

【Key words】 Models, animal; Liver neoplasms, experimental; Cryosurgery; Treatment outcome; Hepatic blood flow

肝癌由于早期症状隐匿,患者被确诊时往往已属晚期,失去了手术切除机会,因此,非手术治疗已成为肝脏肿瘤治疗的重要组成部分。其中,冷冻治疗以其微创、影像引导等优点日益受到关注,然而由于受冷冻范围的限制,目前主要用于小肝癌的治疗^[1]。如何提高肝癌冷冻范围和治疗效果是目前亟待解决的问题。本研究通过改变兔 VX₂ 肝脏肿瘤模型的肝动脉血流,探讨肝动脉血流对氩氦超低温冷冻治疗效果的影响。

资料与方法

1. 实验材料:氩氦冷冻消融系统(CryocareTM, Surgical System),美国 Endocare 公司产品, Olympus bx51 型光学显微镜, GE16 层螺旋 CT 机。氯化硝基四氮唑蓝(TTC)购自美国 Amesco 公司,用 pH 值 7.4~7.6 的磷酸盐缓冲液配成 2% 浓度,4℃ 冰箱避光保存^[2]。戊巴比妥钠注射液,购自北京双鹤药业股份有限公司,冰冻组织切片四甲基偶氮唑(MTT)染色试剂盒购自上海杰美基因公司。

2. 实验动物及肿瘤模型制作:荷瘤种兔购自中国协和医科大学基础医学院病理教研室,新西兰大白兔购自天津医科大学动物中心,雌雄不限,体重在 2.0~2.5 kg,标准条件喂养。肿瘤模型的制作:剥取荷瘤种兔大腿处皮下瘤块,剔除坏死及纤维组织,选取灰白色鱼肉样肿瘤组织,剪切成 1 mm×1 mm×1 mm 瘤块,浸泡于无菌生理盐水中备用。健康新西兰大白兔以 3% 戊巴比妥钠 30~35 mg 由耳缘静脉缓慢推入,麻醉满意后,取平卧位,固定四肢,常规备皮、消毒,剑突下正中切口,暴露肝脏左中叶。用无菌棉签轻轻将肝左中叶夹出,在肝腹侧面用 18 G 穿刺针穿刺,深度约 0.5 cm,用眼科镊将肿瘤块放入,用明胶海绵封堵通道止血。用庆大霉素 4 万 U 腹腔喷洒,逐层关腹,术后连续给予庆大霉素 2 万 U/kg,肌肉注射 3 d。

3. 调整肝动脉血流及 CT 灌注扫描:于肿瘤种植后第 14 天,将种植肿瘤成功的 30 只模型兔按体重编号,采用随机数字表法随机等分成 A、B、C 3 组。实验兔一侧耳缘静脉用于麻醉,一侧引入留置针,固定备用。A 组兔:为肝动脉完全阻断组,分离肝动脉,丝线结扎,然后肝脏复位,行肝脏 CT 平

扫(图 1)。扫描参数:80 kV, 120 mA, 矩阵 512×512, 层厚、层间距均为 5 mm, 观察肿瘤生长情况。根据平扫图像选取肿瘤最大层面,经兔耳缘静脉用自动高压注射器以 0.8 ml/s 的流率、按 1.5 ml/kg 的剂量注入碘海醇(稀释比例为 1:1),自开始团注对比剂后立即启动快速动态扫描程序进行扫描,总扫描时间为 50 s。将所得数据传输至 GE AW 4.1 工作站,利用 Perfusion 3 中的肝脏灌注软件(去卷积算法)进行数据处理,计算并显示能够反映肿瘤组织血流灌注状态的伪彩灌注参数图像。在各灌注图像上通过感兴趣区(ROI)测量计算能够反映肿瘤组织血流灌注状态的灌注参数,包括血流量(blood flow, BF)、血容量(blood volume, BV)。B 组:为肝动脉部分阻断组,实验兔术前 60 min 经腹腔给予亚砷酸,浓度为 1 mg/ml, 2~6 mg/kg, 部分阻断肝动脉。给药后 50 min 开始麻醉,60 min 时行 CT 灌注扫描,参数同上。C 组:为对照组,不阻断肝动脉,直接行肝脏肿瘤 CT 平扫及灌注扫描,扫描参数同前。

4. 冷冻治疗及组织病理染色检查:CT 灌注扫描结束后,开腹直视下将 2 mm 冷冻器插入肿瘤中心,启动氩气,60% 功率冷冻 90 s,氦气复温,拔出冷冻器(图 2)。处死实验兔,游离并取出肝脏,沿冷冻中心切开肿瘤组织,一半浸泡于新鲜配置的 2% TTC 溶液中,置于 37℃ 水浴箱中避光放置 3 min,行 TTC 染色;另一半做冰冻切片,厚度为 6~8 μm,按说明书行 MTT 染色。

5. 统计学方法:实验所得数据采用 SPSS 11.0 统计软件包,组间比较采用方差分析,组内两两比较采用 q 检验 P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 模型兔 CT 平扫与灌注表现:肿瘤种植后第 14 天,CT 平扫发现肿瘤区域呈等或低密度改变,与邻近周围组织分界不清。静脉注入对比剂后,调整肝动脉血流前灌注扫描图像显示肿瘤呈明显较均匀强化,边界仍不清楚。调整肝动脉血流后各组 BF 及 BV 差异有统计学意义(表 1,图 3~11)。

2. 病理结果:TTC 染色可见肿瘤组织中边界清楚的未着色冷冻区域,平均最大冷冻直径 A 组为(2.3±0.3) cm, B 组为(1.5±0.2) cm, C 组为

(0.8 ± 0.1) cm, 3 组差异有统计学意义 (F 值为 315.32, $P < 0.01$; 图 12 ~14)。MTT 染色可见界限清楚的冷冻区、交界带及周围正常染色区。在冷冻区内无蓝黑色颗粒, 表明组织完全坏死; 交界带少量蓝黑色颗粒; 周围未冷冻组织则正常染色。在未结扎肝动脉的 C 组可见无染色的冷冻区内, 部分大血管周围组织染色阳性, 而 A 组未发现此现象 (图 15 ~17)。

表 1 3 组实验兔肿瘤组织内血流灌注量参数 (均 \pm s)

| 组别 | 动物数 (只) | 血流量 ($\text{ml} \cdot 100 \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) | 血容量 ($\text{ml}/100 \text{g}$) |
|----------|---------|---|----------------------------------|
| 肝动脉完全阻断组 | 10 | 7.23 ± 2.15 | 1.63 ± 0.52 |
| 肝动脉部分阻断组 | 10 | 32.65 ± 6.12 | 9.32 ± 2.63 |
| 对照组 | 10 | 61.34 ± 12.15 | 17.51 ± 3.14 |
| F 值 | | 452.16 | 421.33 |
| P 值 | | < 0.01 | < 0.01 |

注: 肝动脉完全阻断组与肝动脉部分阻断组、肝动脉完全阻断组与对照组、肝动脉部分阻断组与对照组两两比较, 血流量的 q 值分别为 15.51、20.41 和 12.24, P 均 < 0.01 ; 血容量的 q 值分别为 18.31、16.24 和 21.51, P 值均 < 0.01



图 1 模型兔行肝脏 CT 平扫及灌注扫描 图 2 开腹直视下行肿瘤冷冻治疗

讨 论

肿瘤的低温冷冻治疗, 是对不能手术切除的肝癌和肝转移瘤的理想治疗方法之一, 但临床资料亦显示冷冻治疗的效果受肿瘤体积及其生长位置的限制。巨块型肝癌或靠近肝门区的肿瘤经冷冻治疗后多存在实际冷冻区域小于预期冷冻范围, 组织坏死范围难以完全覆盖肿瘤或肿瘤局部坏死不完全的缺陷。

1967 年, Gage 等提出了“热池效应”, 认为流动的血液带走了冷冻的能量, 限制了冷冻范围^[3]。因

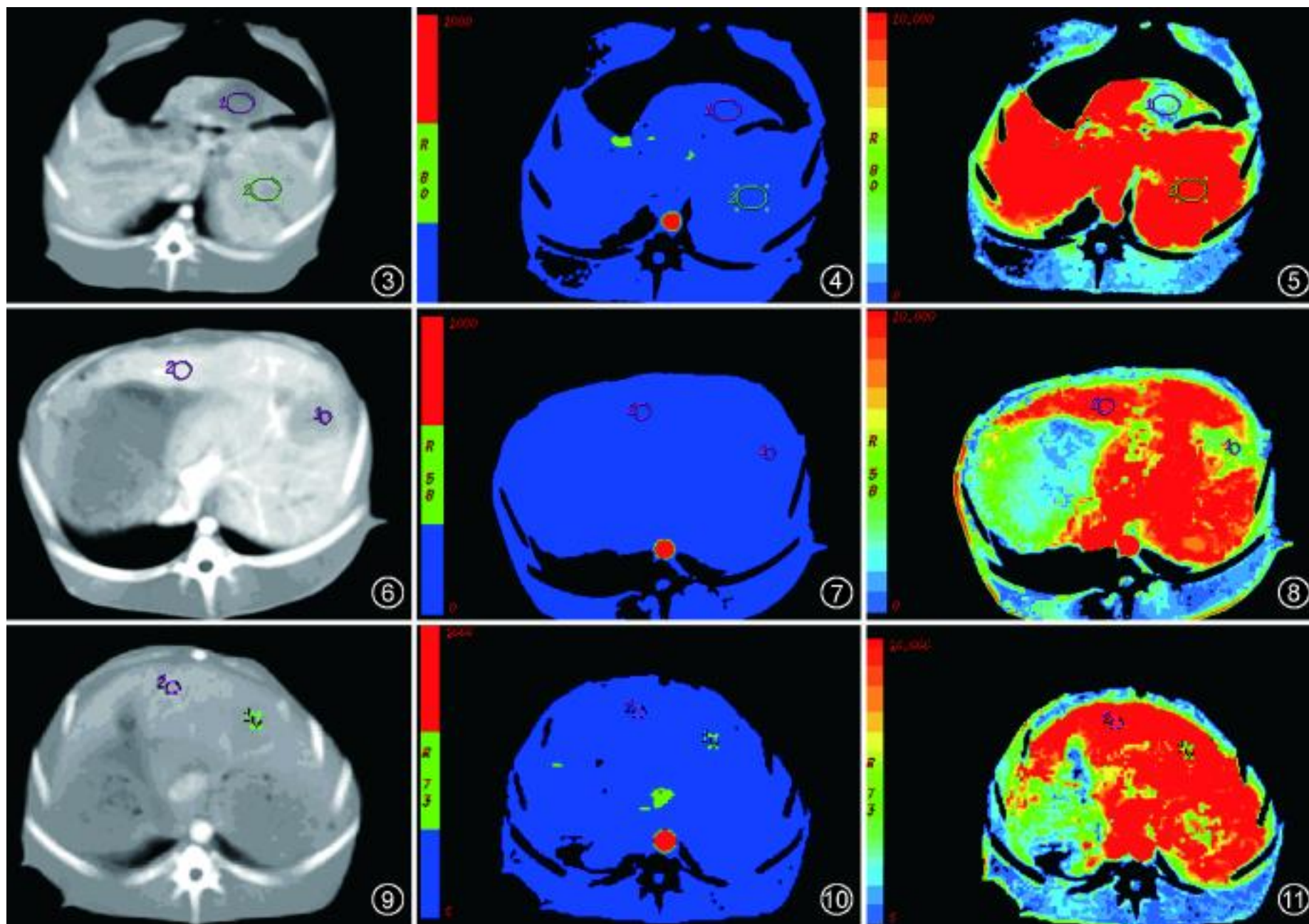


图 3 ~11 3 组模型兔 CT 平扫与灌注表现: 图 3 ~5 分别为肝动脉完全阻断组 CT 平扫、血流量 (BF) 图和血容量 (BV) 图, 图 6 ~8 分别为肝动脉部分阻断组的 CT 平扫、BF 图和 BV 图, 图 9 ~11 分别为对照组 CT 平扫、BF 图和 BV 图, 由图可见肝动脉完全阻断组肿瘤 BF、BV 最低, 表明微灌注量最少; 对照组 BF、BV 最高, 表明微灌注量最大

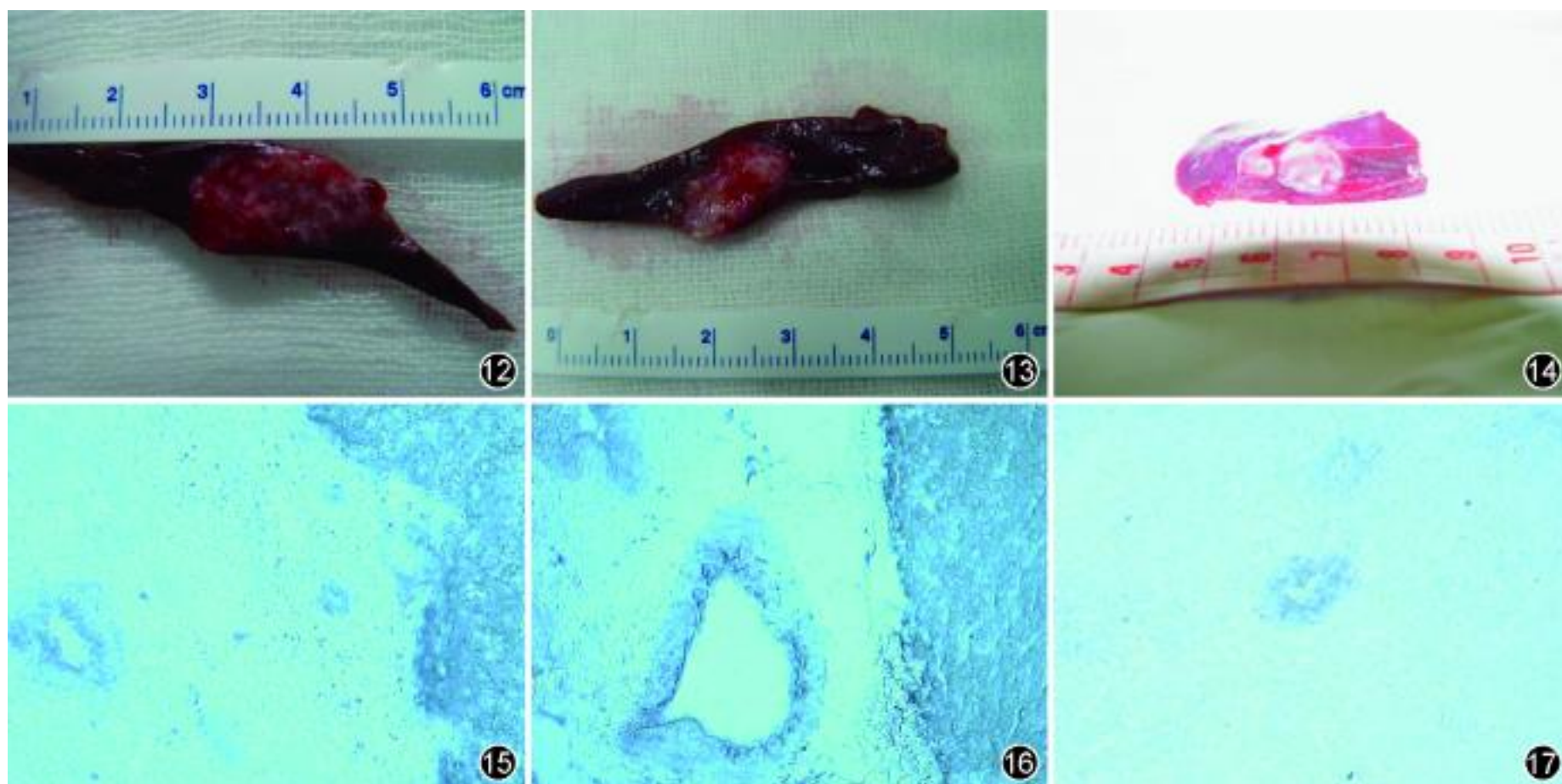


图 12 ~14 3 组氯化硝基四氮唑蓝 (TTC) 染色图, 可见边界清楚的未着色冷冻区域, 图 12 ~14 分别为肝动脉完全阻断组、肝动脉部分阻断组及对照组结果, 平均最大冷冻直径肝动脉完全阻断组最大, 对照组最小 图 15 ~17 四甲基偶氮唑 (MTT) 染色图 ($\times 100$)。图 15 为肝动脉完全阻断组, 可见界限清楚的冷冻区、交界带及周围正常染色区。图 16, 17 分别为肝动脉部分阻断组及对照组, 可见无染色的冷冻区及交界带内部分大血管周围组织染色阳性

此, 血流丰富的脏器, 肿瘤冷冻消融治疗效果差。肝癌患者肝动脉供血占 90% 以上^[4], 且大肝癌约 80% 为丰富供血型^[5]。临床研究亦发现, 肝癌患者行肝动脉栓塞后再行氩氦冷冻治疗, 可明显提高疗效^[6]。由此, 考虑肝动脉血流量有可能影响肝癌的冷冻治疗效果。

兔 VX₂ 肝癌肿瘤模型的肿瘤由肝动脉供血^[7], 是研究本问题的理想模型。本实验结果显示 A 组肿瘤组织的 BF 和 BV 最小, C 组最高, 3 组间差异有统计学意义, 表明实验兔肝脏的血流量调控效果好, 符合实验要求。

TTC 染色是一种用于评价组织内脱氢酶活性的大体标本染色方法, 能区分坏死组织和非坏死组织^[8], 曾被用于观察射频消融、微波等治疗后的病理改变^[9]。本实验肿瘤组织冷冻后行 TTC 染色, 坏死组织与周围有活性的组织分界清楚, A 组平均最大冷冻直径最大, C 组最小, 表明随肿瘤内血流灌注增加, 冷冻效率降低。MTT 染色是一种酶组织化学染色方法。癌组织经冷冻消融后, 检测其还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸心肌黄酶 (NADH-diaphorase) 的活性改变, 能较敏感地反映冷冻对肝癌细胞的灭活效应。本实验采用 MTT 染色, 阳性组织表现为胞质内有大量蓝黑色颗粒, 而坏死区域由于细胞内酶被破坏, 染色阴性。冰冻切片在染色后可见界限清

楚的冷冻区、交界带及周围正常染色区; 在未冷冻区域, 有大量蓝黑色颗粒, 在冷冻边缘的交界带, 有少量蓝黑色颗粒, 说明坏死不彻底。C 组实验兔癌组织冷冻区及交界带内, 部分血管内皮完整, 血管周围有活细胞存在, 说明大血管内血流对其周围组织有保护作用, 使冷冻效率降低。

本实验结果表明, 肝动脉血流是影响冷冻效率的重要因素之一, CT 灌注成像是定量评估肿瘤微循环灌注量的有效手段。因此, 在临床实践中综合应用各种方法减少肝动脉血流, 可增强冷冻治疗肝癌的效果。

参 考 文 献

- [1] Hinshaw JL, Lee FT Jr. Cryoablation for liver cancer. *Tech Vasc Interv Radiol*, 2007, 10: 47-57.
- [2] Arlettaz A, Portier H, Lecoq AM, et al. Effects of short-term prednisolone intake during submaximal exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 2007, 39: 1672-1678.
- [3] Abbas G, Schuchert MJ, Pennathur A, et al. Ablative treatments for lung tumors: radiofrequency ablation, stereotactic radiosurgery, and microwave ablation. *Thorac Surg Clin*, 2007, 17: 261-271.
- [4] Arai Y, Takeuchi Y, Inaba Y, et al. Percutaneous catheter placement for hepatic arterial infusion chemotherapy. *Tech Vasc Interv Radiol*, 2007, 10: 30-37.
- [5] Forner A, Real MI, Varela M, et al. Transarterial chemoembolization for patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 2007, 37: 230-237.
- [6] 郭志, 邢文阁, 刘方, 等. 氩氦冷冻在原发巨块型肝癌介入治

疗中的临床应用. 中华放射学杂志, 2005, 39: 195-203.

[7] Wang D, Bangash AK, Rhee TK, et al. Liver tumors: monitoring embolization in rabbits with VX₂ tumors: transcatheter intraarterial first-pass perfusion MR imaging. Radiology, 2007, 245: 130-139.

[8] Onogi H, Minatoguchi S, Chen XH, et al. Edoxone reduces myocardial infarct size and improves cardiac function and remodelling in rabbits. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33:

1035-1041.

[9] Bhowmick S, Swanlund DJ, Coad JE, et al. Evaluation of thermal therapy in a prostate cancer model using a wet electrode radiofrequency probe. J Endourol, 2001, 15: 629-640.

(收稿日期: 2007-12-03)

(本文编辑: 高宏)

· 病例报告 ·

胸廓入口食管恶性纤维组织细胞瘤一例

吴光耀 雷皓

患者 女, 43 岁, 因吞咽困难和消瘦数月入院。实验室检查: 血红蛋白 6.0 g/L, 癌胚抗原(CEA)和糖链抗原19-9(CA19-9)阴性。CT 扫描示胸廓入口至主动脉弓上后纵隔肿瘤, 与食管呈广基底连接, 食管受压向左移位; 管腔狭窄呈裂隙状, 边缘不清楚。气管左后壁稍显受压, 管壁完整。与肌肉比较, 肿瘤平扫呈低密度, 欠均匀; 增强扫描呈轻度强化(图 1, 2)。多平面重组显示主动脉弓上椭圆形肿瘤, 被大血管包绕, 大小为 4 cm × 8 cm(图 3)。手术病理表现: 经胸廓入口行食管切除术, 肿瘤未侵犯邻近血管和气管组织。肿瘤大小为 4.1 cm × 5.2 cm × 8.1 cm, 为食管来源, 呈外生性生长, 侵犯食管外膜。光学显微镜示, 纤维脂肪组织内见组织细胞和多形性巨细胞增生, 胞质丰富和奇异性核(图 4)。免疫组织化学: CD68 和波形蛋白为阳性, 平滑肌肌动蛋白、S100 蛋白和 CD117 均为阴性, 诊断为胸廓入口食管恶性纤维组织细胞瘤(malignant fibrohistiocytoma, MFH)。

讨论 MFH 是来源于原始间叶组织的恶性肿瘤, 发生在食管的 MFH 极其罕见。笔者复习文献^[1-3]结合本例, 总结其 CT 表现为: 病灶最大径 3.3 ~ 12.0 cm, 平均为 8.9 cm, 表现为边界不清的占位性病变, 与肌肉组织密度相近, 增强后可强化; 病灶内可有坏死、囊变, 少见钙化; 肿块易侵犯邻近组织器官。Tateishi 等^[4]报道 MFH 在 T₂WI 上与肌肉比较呈高信号, 在 T₁WI 上呈不均匀稍低信号。Miller 等^[5]报道 MFH 在 T₂WI 上表现为边界不清、内部见低信号间隔和不均匀高信号坏死囊变区。MFH 需要与其他多形性肿瘤如食管平滑肌肉瘤、多形性横纹肌肉瘤和脂肪肉瘤等鉴别, 免疫组

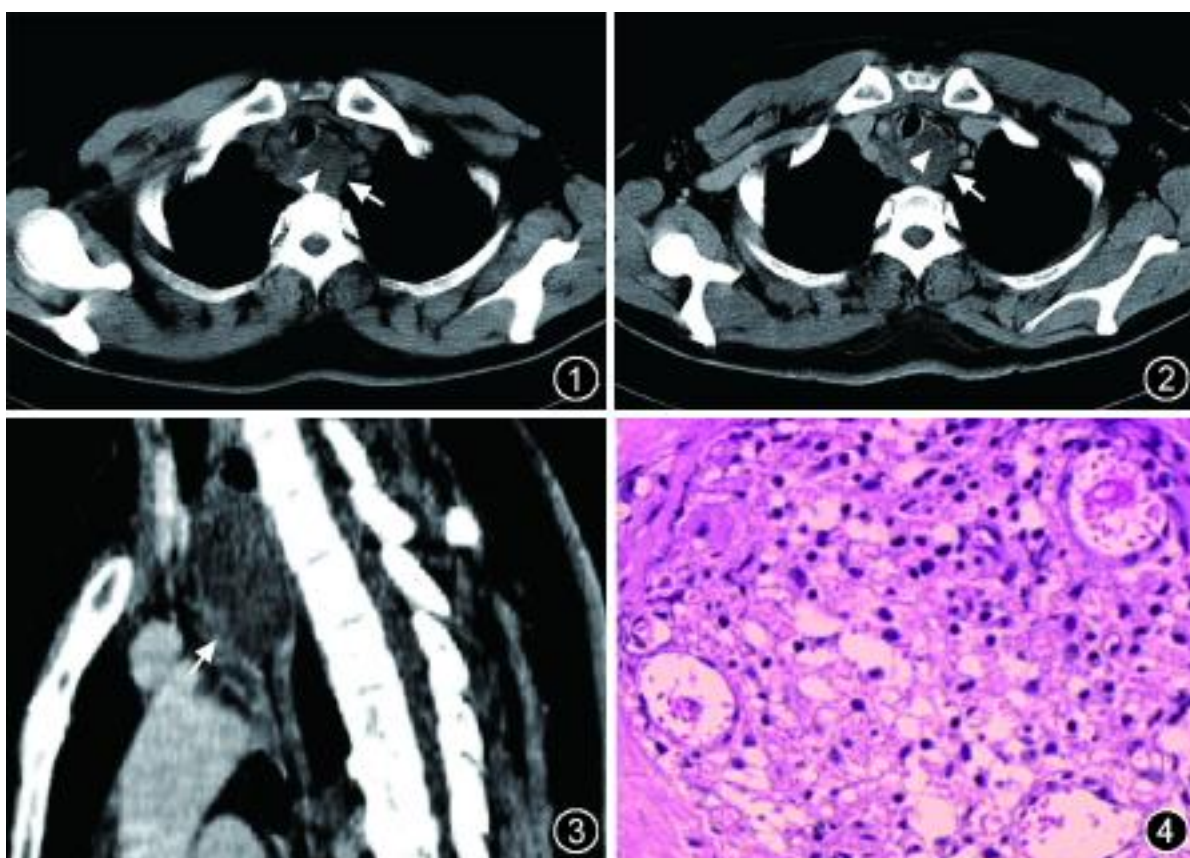


图 1, 2 分别为 CT 平扫和增强扫描, 胸廓入口后纵隔肿瘤与肌肉比较, 平扫呈低密度, 增强扫描呈轻度强化(箭头); 食管受压向左移位, 管腔狭窄呈裂隙状(箭) 图 3 矢状面多平面重组图像, 胸廓入口至主动脉弓上椭圆形肿瘤, 被大血管包绕(箭) 图 4 光学显微镜下示纤维脂肪组织内见组织细胞和多形性巨细胞增生, 胞质丰富和奇异性核(HE × 200)

织化学结果对鉴别有帮助。

参 考 文 献

- [1] 张振华, 王恂, 李书鹏, 等. 肝脏恶性纤维组织细胞瘤并肝内转移一例. 中华放射学杂志, 2006, 40: 1226.
- [2] Sapi Z, Papp I, Bodo M. Malignant fibrous histiocytoma of the esophagus. Acta Cytol, 1992, 36: 121-125.
- [3] Naganuma H, Ohtani H, Sayama J, et al. Malignant fibrous histiocytoma of the esophagus. Pathol Int, 1996, 46: 462-466.
- [4] Tateishi U, Kusumoto M, Hasegawa T, et al. Primary malignant fibrous histiocytoma of the chest wall: CT and MR appearance. J Comput Assist Tomogr, 2002, 26: 558-563.
- [5] Miller TT, Hermann G, Abdelwahab IF, et al. MRI of malignant fibrous histiocytoma of soft tissue: analysis of 13 cases with pathologic correlation. Skeletal Radiol, 1994, 23: 271-275.

(收稿日期: 2007-11-29)

(本文编辑: 张晓冬)